

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Lee et al.

Serial No.: To Be Assigned

Filed: January 30, 2002

Art Unit: To Be Assigned

Examiner: To Be Assigned

Atty. Docket: 0217-0008

For: **A METHOD FOR IDENTIFYING
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AND
MYCOBACTERIA OTHER THAN
TUBERCULOSIS, TOGETHER WITH
DETECTING RESISTANCE TO AN
ANTITUBERCULOSIS DRUG OF
MYCOBACTERIA OBTAINED BY MUTATION
OF RPOB GENE**

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

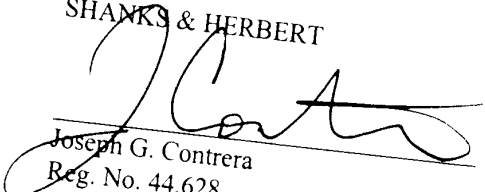
Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Korea	2001-43450	July 19, 2001

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,

SHANKS & HERBERT


Joseph G. Contrera
Reg. No. 44,628

Date: 1/30/02
TransPotomac Plaza
1033 N. Fairfax Street, Suite 306
Alexandria, VA 22314

10/058422
01/30/02

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : Application Number	특허출원 2001년 제 43450 호 PATENT-2001-0043450
출원년월일 : Date of Application	2001년 07월 19일 JUL 19, 2001
출원인 : Applicant(s)	주식회사 제니스라이프사이언스 XENISS LIFE SCIENCE CO., LTD.

2001 08 09
 년 월 일

특 허 청 장
COMMISSIONER

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.07.19
【발명의 명칭】	마이코박테리아의 동정 및 rpoB 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 항 결핵제 내성의 동시 검출 방법
【발명의 영문명칭】	A method for identifying Micobacteria tuberculosis and non-tuberculosis Micobacteria, together with detecting resistance to an antituberculsis drug of Micobacteria obtained by mutation of rpoB gene
【출원인】	
【명칭】	주식회사 제니스라이프사이언스
【출원인코드】	1-1999-036777-5
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	9-1998-000434-4
【대리인】	
【성명】	남희섭
【대리인코드】	9-1999-000451-4
【발명자】	
【성명】	이혜영
【출원인코드】	4-1999-053224-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	방혜은
【성명의 영문표기】	BANG,Hye Eun
【주민등록번호】	730902-2074216
【우편번호】	153-010
【주소】	서울특별시 금천구 독산동 주공아파트 1314동 1512호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조상래
 【성명의 영문표기】 CH0,Sang-Nae
 【주민등록번호】 520626-1228411
 【우편번호】 158-056
 【주소】 서울특별시 양천구 목6동 929 한신아파트 111동 602호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 배길한
 【성명의 영문표기】 BAI,Gill-Han
 【주민등록번호】 470502-1906316
 【우편번호】 463-080
 【주소】 경기도 성남시 분당구 내정동 파크타운 129동 805호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김상재
 【성명의 영문표기】 KIM,Sang-Jae
 【주민등록번호】 410912-1079418
 【우편번호】 138-050
 【주소】 서울특별시 송파구 방이동 89 선수촌아파트 310동 103호
 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 30
 【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 윤동열 (인) 대리인
 이선희 (인) 대리인
 남희섭 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 26 면 26,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 7 항 333,000 원

【합계】 388,000 원

【감면사유】 중소기업

【감면후 수수료】 194,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장_1통 3. 중소기업법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류 _3통

【요약서】

【요약】

본 발명은, 결핵균 및 비결핵균 마이코박테리아(*mycobacterium other than tuberculosis*; MOTT)의 동정과 함께, 결핵균 및 MOTT의 돌연변이에 의해 얻어지는 항결핵제 약제 내성 여부를 동시에 검출하는 방법을 제공한다.

【대표도】

도 6

【색인어】

결핵균*비결핵균 마이코박테리아*동정*항결핵제 내성

【명세서】

【발명의 명칭】

마이코박테리아의 동정 및 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 항결핵제 내성의 동시 검출방법{A method for identifying *Micobacteria tuberculosis* and non-tuberculosis *Micobacteria*, together with detecting resistance to an antituberculosis drug of *Micobacteria* obtained by mutation of *rpoB* gene}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 결핵균의 *rpoB* 유전자 지도를 나타내는 도면이다.

도 2는 마이코박테리아의 표준균주에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머로 PCR 증폭하였을 때, *rpoB* 유전자 중, 531bp 크기의 DNA 단편이 증폭됨을 보여주는 도면이다.

(여기에서, M은 Gene Ruler™ DNA 크기마커이고, 레인 1~13은 차례대로 결핵균(*M. tuberculosis*), *M. 아비움*(*avium*), *M. 인트라셀룰라레*(*intracellulare*), *M. 스크로풀라세움*(*scrofulaceum*), *M. 스줄가이*(*szulgai*), *M. 고도나에*(*gordonae*), *M. 칸사시아*(*kansasii*), *M. 압스세스*(*abscessus*), *M. 켈로나에*(*chelonae*), *M. 카스트리*(*gastri*), *M. 포르투이툼*(*fortuitum*), *M. 얼서란스*(*ulcerans*), *M. 테라에*(*terrae*)의 표준균주이며, 레인 14는 PCR 음성 대조군을 나타낸다.)

도 3은 결핵균 및 비결핵균 마이코박테리아의 표준균주에 대하여, 본 발명의 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 분석을 수행한 결과로, 각 균종들의 PCR 증

폭산물이 종 특이적 올리고머 프로브에 종 특이적으로 하이브리드형성함을 보여 주는 도면이다.

도 4는 비결핵균 마이코박테리아 임상균주에 대하여 본 발명의 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 분석을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 분석을 수행하면, 결핵균의 동정과 함께, 결핵균의 리팜핀 내성 또는 감수성 여부를 동시에 검출할 수 있음을 보여주는 도면이다.

(도 5에서, 레인 1~6은 리팜핀 감수성 결핵균을 나타내며, 레인 7은 PCR 증폭산물의 514-520 위치의 돌연변이로 인한 리팜핀 내성 결핵균을, 레인 8~15는 PCR 증폭산물의 524-529 위치의 돌연변이로 인한 리팜핀 내성 결핵균을, 레인 16은 PCR 증폭산물의 511 위치의 CCG로의 돌연변이로 인한 리팜핀 내성 결핵균을, 레인 17은 PCR 증폭산물의 513 위치의 CCA로의 돌연변이로 인한 리팜핀 내성 결핵균을, 레인 18~19는 PCR 증폭산물의 516 위치의 GTC로의 돌연변이로 인한 리팜핀 내성 결핵균을, 레인 20은 PCR 증폭산물의 526 위치의 AAC로의 돌연변이로 인한 리팜핀 내성 결핵균을, 레인 21은 PCR 증폭산물의 531 위치의 TGC로의 돌연변이로 인한 리팜핀 내성 결핵균을, 레인 22~35는 PCR 증폭산물의 531 위치의 TTG로의 돌연변이로 인한 리팜핀 내성 결핵균을 나타낸다.)

도 6은 37개의 임상 시료로부터 결핵균 및 MOTT의 동정 및 리팜핀에 대한 내성 여부의 검출을, PCR-블랏 하이브리드형성 방법을 통해 동시에 수행한 실험 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 결핵균에 대한 PCR 증폭시, 증폭되는 531-bp의 DNA 단편의 서열을 나타낸 도면이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<10> 결핵은, 결핵환자가 기침이나 재채기할 때 나오는 비말핵(droplet)에서 검출되는 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의해 감염되는 만성 소모성 질환으로, 전세계적으로 감염성 질환 중에서 사망률과 이환률 1위를 차지하는 심각한 보건문제이다(1)(괄호안의 숫자는 참고문헌 번호를 나타내며, 하기 참고문헌에 그 상세사항을 기재하였다. 이하, 같다.).

<11> 현재 결핵균 보균자는 전세계 인구의 3분의 1에 해당하는 약 19억명에 이르며, 결핵균 보균자 중에서 매년 800~1,000만명이 결핵환자로 발전하며, 이중 약 300만명은 결핵으로 사망한다(2-4). 우리나라만도 전 인구의 절반이 결핵균 보균자이고, 매년 약 15만명의 결핵환자가 새롭게 발생되며, 이중 14,000여명이 결핵으로 사망하고 있는 실정이다.

<12> 그럼에도 불구하고, 그동안 결핵은 주로 개발도상국가만의 문제로 여겨져, 선진과학·의료계로부터 다소 경시되어 왔으며, 연구인력 및 전문인력의 양성이 소홀했다(5). 그러나, 결핵균에 중감염된 HIV 환자에게서는 결핵발병이 폭발적으로 증가된다는 사실이 밝혀짐으로써, 전세계적으로 급격히 확산되고 있는 HIV의 공포와 함께 결핵문제의 심각성도 더욱 대두되고 있다. 현재, 전세계적으로

약 1,500만명 가량이 결핵균과 HIV에 동시에 감염되어 있는 것으로 추산되며, 조만간 이들은 거의 모두 결핵으로 이환되어 사망할 것으로 예측되고 있다(6).

<13> 한편, 결핵은 개발도상국에서 지속적으로 관리되어야 할 중요 보건문제로 남아 있으나, 이들 나라에서는 항결핵제의 부족과 부적절한 치료·관리로 인해 약제내성균을 보유한 만성 배균자가 증가하게 되었다(7). 특히, 다제(多劑)내성 결핵균의 출현과 그 빈도의 증가는 결핵에 의한 사망자수의 증가와 결핵의 신속한 퇴치에 큰 장애를 가져왔다. 약제내성 결핵균에 대한 조사에 의하면, 한가지 약제 이상에 내성을 가지는 결핵균은 나라별로 전체 결핵균의 2~35%에 달하고 있어, 약제내성 결핵균의 빈도가 심각한 수준에 이르렀음을 보여주고 있으며(8,9), 일부 지역에서는 치료경력이 없는 환자에서조차 다제내성 결핵균에 감염된 빈도가 14%에 달한다고 보고되었다(10).

<14> 이와 같이, 중대한 감염성 질환인 결핵관리의 핵심은, 전염성 환자를 조기에 발견하여 완치를 통해 새로운 결핵감염을 막는 것이다. 따라서, 결핵관리의 최우선 과제는 결핵환자의 치유율을 제고(提高)하는 것이다. 결핵은, 근본적으로 이소니아지드(isoniazid; INH)와 리팜핀(rifampicin; RMP)을 주치료제로 하여 6개월간 지속적으로 복용하는 화학요법으로 치료가 가능한 질병이지만(11), 치료기간동안 약의 복용을 멈추면, 기존의 항결핵약제에 대한 약제내성을 갖는 결핵균이 급격히 증가하기 때문에, 불완전한 환자관리가 결핵관리에 가장 큰 문제가 되고 있다.

<15> 세계보건기구(WHO)에 따르면, 한 명의 난치성 결핵환자가 적절히 치료되지

않고 방치될 경우, 약 12명의 새로운 결핵환자가 발생한다고 한다. 선진국의 예를 든다면, 한 명의 결핵환자를 치료하는 데 소요되는 비용은 \$2,000 정도인데 약제내성 결핵환자를 치료는 비용은 이의 125배에 해당하는 \$250,000에 달하며, 이 환자들이 가정과 사회활동의 붕괴로 인한 경제적 손실만도 연간 약 1억 5천만 원에 이르는 것으로 보고되고 있다(12, 13).

<16> 이와 같은 약제내성 결핵은, 치료에 막대한 비용이 들 뿐 아니라 치료 효율도 낮아 사망률이 증가되는 난치성 결핵으로 발전되므로, 조기진단에 의한 효과적인 처방으로 환자를 적절히 치료하여, 결핵균이 전파되는 것을 차단해야 할 것이다. 하지만, 현재 우리나라를 포함한 대부분의 나라에서 사용되고 있는 결핵균의 약제감수성 검사는 8~10주간의 장시간이 소요되는 미생물학적 배양방법을 이용하고 있다. 이 방법은, 각각의 항결핵 약제를 함유한 고체배지와 약제를 함유하지 않은 대조 배지상의 콜로니형성 여부를 관찰하여 감수성 여부를 판정하는 방법이다(14). 이같은 방법은 현재 우리나라를 포함한 대부분의 나라에서 결핵균의 약제감수성 검사에 사용되고 있으나, 검사기법이 매우 복잡하고 오랜 경험과 숙련된 기술자를 필요로 하므로, 검사기관을 제한하여 엄격한 관리를 요구하고 있다.

<17> 따라서, 신속하고 정확하게 결핵균의 약제 감수성을 진단하는 기술은, 결핵균에 대한 올바른 처방 전략을 수립할 수 있게 하여 결핵의 치료율을 높일 수 있고, 약제내성 결핵균의 전파로 인한 난치성 결핵의 증가를 조기에 차단할 수 있어, 결핵의 예방, 퇴치 및 결핵으로 인한 국가경제력의 손실을 방지할 수 있는 중요한 보건의료 기술이라고 할 수 있다.

<18> 고체배지를 사용하는 미생물학적 배양법에 소요되는 긴 검사시간을 줄이기 위해서, 최근 액체배지를 사용하는 새로운 약제감수성 검사법이 개발되었다. 이 검사법은, 미국의 Becton Dickinson社에서 개발된 BACTEC system 등의 기기를 사용하는 방법으로, 결핵균을 액체배지에 접종시키고 결핵균이 자라면서 만들어내는 대사산물을 방사선동위원소를 사용하여 측정하는 방법이다. 또한, 결핵균의 대사에 의해 일어나는 액체배지의 화학적 조성 변화를 형광의 형태로 측정할 수 있는 방법인 MGIT(myco-bacterium growth indicator tube) 등도 개발된 바 있다. 이와 같은 약제 감수성검사에서는, 결핵균이 자라기 시작하면서 만들어내는 결핵균의 대사산물을 측정하므로, 고체배지를 이용한 방법보다 비교적 짧은 시간(4-6일)에 검사결과를 얻을 수 있는 장점이 있다.

<19> 그러나, BACTEC이나 MGIT 등의 액체배지를 사용한 검사법은, 검사에 사용할 수 있는 약제가 제한적이며, 이들 액체배지에 비결핵균 마이코박테리아 (Mycobacteria other than tuberculosis: MOTT)도 자랄 수 있어, 결핵균 및 비결핵균 마이코박테리아의 동정을 위해서, Gen-probe사에서 생산되는 AccuProbe라고 하는 배양물 확인용(culture confirmation) 분자생물학적 키트를 사용해야 한다는 문제점이 있다. 또한, 검체에 두 가지 이상의 마이코박테리아 균종이 혼재되어 있는 경우, 부적당한 결과가 초래되는 문제점도 포함하고 있다. 이를 방지하기 위해서, 고체배지에서 순수 배양된 결핵균을 사용하거나, 검사결과가 내성균으로 나온 검체 내의 균이 결핵균인지의 여부를 다시 확인해야 하므로, 다시 3-4주 가량이 결핵균의 순수배양에 소요되므로, 실제로 정확한 약제감수성 결과에 필요한 시간은 4~5주에 달하게 된다.

<20> 약제감수성을 진단하기 위한 시간을 단축하기 위해서, 유전자 이용기술을 이용한 약제내성 검사법이 개발되었다. 최근, 여러 항결핵약제의 내성기작을 분자생물학적 방법으로 밝혀낸 연구결과에 의하면, 결핵균의 약제내성은 항생제가 표적하는 유전자 부위의 돌연변이로 인해 발생하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 항결핵 약제 중 가장 강력한 효과를 나타내는 약제인 리팜핀에 대한 결핵균의 내성 획득 기전은, 이 약제의 표적부위인 RNA 폴리머라아제의 ?? subunit (*rpoB* gene)에 10^{-8} 의 빈도로 유전자 변이가 생김으로써 저항성이 획득되고, 단지 1개의 뉴클레오타이드 변이에 의해서도 이 약제에 대한 내성이 생긴다고 보고되었다(13, 15). 또한, 내성결핵균의 97% 이상이, *rpoB* 유전자 내 69-bp의 변이에 의해 약제 내성을 획득하므로, 이러한 특성을 이용하여 내성결핵균을 신속하게 검출할 수 있는 키트가 개발되었다.

<21> 한편, 결핵균이 속해있는 마이코박테리아(*Mycobacteria*) 속(屬: genera)은 결핵을 일으키는 결핵균(*M. tuberculosis*) 및 나병을 일으키는 나균(*M. leprae*) 등의 주요 균종 외에 비결핵균 마이코박테리아(*mycobacterium other than tuberculosis*: 이하, 'MOTT'라 함)라고 불리우는 여타 마이코박테리아 균종(種: species)들을 포함한다. 이들 MOTT는 기회성 감염균으로서, 주로 면역력이 약화된 환자에게서 감염을 일으키는 것으로 알려져 있으나, 정상인에게도 감염을 일으키는 것이 보고되어 있다. 특히, 1980년 이후 선진국에서는 MOTT의 하나인 *M. 아비움*(*avium*)이 AIDS 환자에게서 결핵을 일으키는 것으로 보고되면서, AIDS의 증가추세와 함께 그 심각성 및 중요성이 부각되고 있다. 또한, *M. 아비움-인트라셀룰라레* 복합체(*avium-intracellulare complex*), *M. 포르투이툼*(*fortuitum*),

M. 켈로나에(chelonae), *M. 고르도나에(gordonae)*, *M. 스줄라가이(szulagai)*, *M. 스크로플라세움(scroflaceum)*, *M. 칸사시아(kansasii)*, *M. 테라레* 복합체(complex), *M. 마리눔(marinum)* 등의 MOTT가 질병과 관련이 있다는 보고가 있으며, 이들 균종들은 피부나 연조직, 근육 골격계 관련 질병 및 폐, 임파선, 드물게는 산재성 항산균증의 원인균으로도 보고되었다. 이와 같이, 여러 종류의 마이코박테리아에 의한 병리현상이 밝혀지고, 다양한 종류의 균이 분리됨에 따라 정확한 마이코박테리아 균동정이 중요하게 되었다. 이는, 정확한 균동정이 환자의 적절한 치료에 매우 중요하기 때문이다. 따라서, 최근 MOTT의 출현이 증가함에 따라, 정확한 결핵균 및 MOTT의 신속하고 정확한 동정이 매우 중요한 문제로 대두되고 있다.

<22> 최근까지 주로 사용되고 있는 결핵균 및 MOTT의 균동정 방법은, 1954년 Timpe와 Runyon이 제안한 미생물학적 방법이 있다. 이 방법은, 마이코박테리아의 성장 속도, 콜로니의 형태와 색소 생산정도 등에 따라 마이코박테리아를 4개의 군으로 분류하고 있다(16). 즉, 이 방법에 따르면, 성장속도가 늦으면서(대개 5-7일) 빛을 받고 자랄 때에 노란색을 띄는 광발색균(I, photochromogens): 빛이 없는 상태에서 노란색이나 오렌지색을 나타내는 암발색균(II, scotochromogens): 빛을 받고 자라거나 빛이 없이 자랄 때 옅은 황색을 나타내거나 색을 띠지 않는 비광발색균(III, nonphotochromogens): 및, 다른 마이코박테리아 보다 성장속도가 비교적

빠른 신속발육균(rapid growers) 등으로 분류된다. 이와 같은 미생물학적 특성과 함께 다양한 생화학적인 특성을 규명함으로써, 보다 세분화된 마이코박테리아의 동정이 가능하게 된다. 따라서, 현재 사용되고 있는 MOTT의 동정법은 미생물학적 및 생화학적 방법으로 많은 종류의 MOTT를 비교적 정확하게 분석할 수 있다. 그러나, 이와 같은 동정법은, 균의 종류에 따라서는 4주까지도 걸리는 균의 성장기간을 요하고, 콜로니가 형성된 후 콜로니의 형태 및 색깔을 구분할 필요가 있으며, 배양된 균을 이용하여 다양한 종류의 생화학적 검사를 시행해야 하므로, 결과를 얻기까지 장기간의 시간(8주)이 요구된다. 또한, 이와 같은 기존의 방법으로 구분하기 어려운 균종도 존재하고, 생화학적 검사결과가 분명치 않은 경우도 존재하여, 동정 결과가 부정확한 경우도 있어, 숙달된 전문가에 의해서만 신뢰할 만한 결과가 얻어지므로, 대부분의 임상실험실에서는 정확한 동정이 불가능한 형편이다.

<23> 미생물학적 분류와 생화학적 검사법을 기초로 한 동정법의 문제점을 극복하기 위해, 현재 선진국에서는, 색층분석기(chromatography)를 이용하여 마이코박테리아의 세포벽 성분인 지질성분을 분석하거나(17-19), 분자생물학적 방법을 이용하는 MOTT의 동정법을 개발하여 사용하고 있다. 색층분석기(chromatography)를 이용하는 방법은, 검사의 특이성이 높아 매우 유용한 방법이지만, 분석에 필요한 시료를 얻기 위해 균을 배양해야 하므로, 균의 성장에 필요한 시간이 소요되어 검사시간을 단축할 수 없고, 고가의 장비를 필요로 하므로 선진국을 중심으로 한 표준실험실(reference laboratory)에서만 검사가 가능하다는 문제점이 있다.

<24> 최근 분자생물학적 방법을 이용한 신속하고 정확한 마이코박테리아의 동정 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 진화과정 중 그 염기서열의 보존성이 높아, 같은 종(種) 간에만 유전자의 변이도가 발견되는 유전자를 프로브로 이용하는 분자생물학적 균동정법도 개발되고 있다. 예를 들면, Genprobe사에서 생산하는 AccuProbe라는 제품은, 16S rRNA 유전자를 프로브로 이용한 결핵균 및 결핵균외 마이코박테리아 동정에 사용된다. 이 제품은, rRNA와 표지화된 DNA의 하이브리드형성(rRNA:labelled DNA hybridization)을 이용한 방법으로, 균종동정에 2일의 시간만이 소요되어 신속하다는 장점이 있으나, 16S rRNA 유전자의 경우 종간에도 염기서열 보존성이 매우 높아, 변별력이 떨어지고, 마이코박테리아의 균종을 동정하기 위해 균정에 따른 각각의 키트를 사용해야 하므로, 한번의 실험에 의해 한가지 균종만을 동정할 수 있는 문제점이 있다(20, 21).

<25> 따라서, 16S rRNA보다 유용하게 마이코박테리아 균동정법에 쓰일 수 있는 유전자 부위에 대한 탐색이 진행되었다. 이들 방법 중, 적은 수의 균으로부터 표적 유전자를 단시간 내에 PCR 증폭하고, 증폭 PCR산물을 분석함으로써, 단시간 내에 균동정을 할 수 있는 분자생물학적 방법의 개발이 개발되었다(22-24). 이 중, 본 발명자들에 의해 개발된 *rpoB* 유전자 부위를 이용한 PCR-RFLP(25)는, 16S rRNA 부위의 염기 다형성을 이용하는 기존의 방법에 비해 훨씬 더 간단하고 신속하며 정확한 마이코박테리아의 균동정법임을 보고한 바 있다(KR 99-46795). *rpoB* 유전자 부위는 종간(種間)에 존재하는 유전자의 보존도가 매우 높아 유전자의 동질성에 의해 모든 마이코박테리아를 검출할 수 있는 유전자인 반면, 마이코박테리아 외의 장내세균에서는 증폭되지 않거나, 증폭된 PCR 산물의 크기가 달라

마이코박테리아에 특이적인 PCR 프라이머를 제작하기에 매우 유용한 유전자이다. 동시에, 각 종간에 유전자의 다형성이 매우 높아 효소절단(restriction enzyme digestion)과 같은 간단한 방법만으로도, 각각의 마이코박테리아를 동정해 낼 수 있어, *rpoB* 유전자를 이용한 PCR-RFLP법은 매우 신속, 정확, 간단하게 마이코박테리아의 균동정, 분류법임을 알 수 있었다.

<26> 한편, 본 발명자들이 수행한 각 마이코박테리아의 *rpoB* 유전자 염기서열 분석을 통해, 각 마이코박테리아의 *rpoB* 유전자 부위에 염기서열의 다형성이 존재하여 DNA-하이브리드형성법에 사용될 수 있는 각 마이코박테리아 종-특이적 프로브를 고안할 수 있었다. 결론적으로, 본 발명자에 의해 처음 밝혀진 *rpoB* 유전자 상의 361bp에 해당하는 유전자 부위가 결핵균 및 MOTT의 동정법 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있는 유전자 부위임을 밝혀낸 바 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<27> 이상을 정리하면, 국가적인 결핵관리 및 결핵의 완치를 위해서는, 신속하고 정확하게 결핵균 및 MOTT를 동정해야되며, 동정된 균종이 항결핵제에 대한 약제 내성을 갖는 균종인지를 신속하게 검출하는 것이 중요하고, 이를 동시에 이루기 위한 많은 연구가 당업계에서 수행되어 왔다.

<28> 이에, 본 발명자들 또한, 결핵균 및 MOTT를 신속하고 정확하게 동정하면서, 동정된 균종의 항결핵제에 대한 내성 여부를 동시에 검출할 수 있는 방법을 찾고자 많은 연구를 수행한 결과, 결핵균 및 MOTT의

rpoB 유전자를 서열번호 1 및 2의 프라이머에 의해 PCR 증폭하여 생성된 531bp의 증폭산물을, 서열번호 3 내지 30의 올리고머 프로브가 부착된 막(membrane)에, PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 방법으로 하이브리드형성 시킴으로써, 결핵균 및 MOTT를 신속하고 정확하게 동정하면서, 동시에 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 마이코박테리아의 항결핵제 내성에 대한 여부를 동시에 검출할 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

<29> 따라서, 본 발명의 목적은, 결핵균 및 MOTT의 균종동정 및 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 마이코박테리아의 항결핵제 내성 여부를 동시에 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

<30> 또한, 본 발명의 다른 목적은, 결핵균 및 MOTT의 균종동정 및 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 마이코박테리아의 항결핵제 내성여부의 동시검출하기 위해 사용되는 *rpoB* 유전자 PCR 증폭용 프라이머를 제공하는 것이다.

<31> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 리버스 블랏 하이브리드 형성을 수행하기 위한 올리고머 프로브 및 상기 올리고머 프로브가 결합된 막을 제공하는 것이다.

<32> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 올리고머 프로브가 결합된 막 및 상기 프라이머, 또는 상기 프라이머, 올리고머 프로브 및 막(membrane)을 포함하는 결핵균 및 MOTT의 균종 동정 및 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 마이코박테리아의 항결핵제 내성여부의 동시검출용 키트를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <33> 상기한 목적을 달성하기 위해서, 본 발명의 방법은,
- <34> 1) 검체 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;
- <35> 2) 프라이머로서 MOTT-rpo-long-B-5' (5'-TCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGC-3': 서열번호 1) 및 TR8-long-NB-3' (5'-ACGGGTGCACGTCGCGGACCTCCA-3': 서열번호 2)를 사용하여, 상기 DNA로부터 *rpoB* 유전자 상의 531bp 크기의 유전자 단편을 PCR 증폭하는 단계; 및,
- <36> 3) 각 마이코박테리아에 종 특이적으로 결합할 수 있는 서열번호 3 내지 20의 올리고머 프로브 및 돌연변이에 의해 결핵균에 내성을 부여하는 *rpoB* 유전자 부위의 돌연변이 또는 야생형 서열과 특이적으로 결합할 수 있는 서열번호 21 내지 30의 올리고머 프로브가 부착되어 있는 막과, 상기 단계 2)에서 얻어진 PCR 증폭산물을 하이브리드형성시키는 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 단계;
- <37> 를 포함하여, 결핵균 및 MOTT를 동정함과 함께, *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 항결핵제 내성 여부를 동시에 검출함을 특징으로 한다.
- <38> 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.
- <39> 상기 단계 1)에서, 검체시료는 결핵균을 보유하고 있는 피검체나 보유하고 있을 것으로 예상되는 피검체로부터 얻어내고, 결핵균은 일반적으로 폐에서 기생하므로, 피검체의 객담으로부터 얻어내는 것이 바람직하다. 또한, 상기 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 널리 주지되어 있는 통상적인 방법으로 수행한다.

<40> 또한, 상기 단계 2)에서, 상기 프라이머 서열은 도 1에 나타낸 *rpoB* 유전자 서열 중, 531bp 크기의 유전자 단편을 PCR 증폭하기 위해 사용된다. 도 7에서 보는 바와 같이, PCR 증폭된 531bp 크기의 유전자 단편 내에는, 1) 모든 마이코박테리아들이 소유하고 있는 보존서열, 2) 마이코박테리아 속에 해당하는 각 마이코박테리아들이 종 특이적으로 소유하고 있어 다형성을 나타내는 서열, 및 3) 돌연변이에 의해 리팜핀과 같은 항결핵제에 대한 내성을 부여할 수 있는 서열을 포함하고 있다. 따라서, 이들 유전자 증폭산물을 이용할 경우, 마이코박테리아의 동정, 결핵균 및 비결핵균 마이코박테리아의 분리, 비결핵균 마이코박테리아의 균주 동정 및 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 마이코박테리아의 항결핵제에 대한 내성여부의 검출을 동시에 행할 수 있다.

<41> 여기에서, *rpoB* 유전자 부위에 돌연변이가 있으면 내성을 갖게되는 결핵 약제로는 리팜핀, 리파마인신 등의 리팜핀 계통의 유도제 등이 있다.

<42> 한편, 상기 단계 3)에서는, 리버스 블랏 하이브리드형성 방법에 의해서, 상기 단계 2)에서 얻어진 *rpoB* 유전자 증폭산물을 상기 올리고머 프로브들에 하이브리드형성을 수행한다. 여기에서, 각 마이코박테리아에 종 특이적으로 하이브리드를 형성할 수 있는 올리고머 프로브의 서열, 및 결핵균의 리팜핀 계열의 항생제에 대한 내성을 부여하는 *rpoB* 유전자 부위의 돌연변이 또는 야생형 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고머 프로브들의 서열은 하기 표 1과 같다.

<43>

【표 1】

올리고머 프로브의 이름	올리고머 프로브의 서열	표적 마이코박테리아
MYC	GACGTCGTCGCCACCATCGA	All types of Mycobacteria
MTB	CATGTCGGCGAGCCC	<i>M. tuberculosis</i> complex
AVI	AAACGGTGAGCCGATCACC	<i>M. avium</i>
INT	AAACCTGCACGGGGCGA	<i>M. intracellularae</i>
SCR	AAAAACGTACGGATGGCCAGC	<i>M. scrofulaceum</i>
KAN-I	AAAGGCCACGATGACCGTG	<i>M. kansasii</i> type I+V
KAN-II	AAAAATCTCAGGATGGCCAGC	<i>M. kansasii</i> type II+III+IV
GAS	AAAAATCTCAGGGTGGCCAGG	<i>M. gastri</i>
FOR-C	CCTGAACGCCGGCCAG	<i>M. fortuitum</i> complex
PER	GTTCCGGTCGAGGTGG	<i>M. peregrinum</i>
CHE	AAATGGTGACTGCCACCACG	<i>M. chelonae</i>
ABS	AAAAGGTGACCACCACCACC	<i>M. abscesus</i>
ULC	GGCCAGCCCATCACC	<i>M. ulcerans</i>
GEN/SIM	CCAGCCGACGATGACG	<i>M. genavense</i> / <i>M. simiae</i>
GOR-I	AAAGTCGGCGATCCGATCA	<i>M. gordonae</i> type I, III, IV
GOR-II	AAAAACGTCGGCAAGCCGA	<i>M. gordonae</i> type II
SZU	AAATCTGAACGTCGGCGAG	<i>M. szulgai</i>
TER	AAAGCTCAGGACGGTCAGT	<i>M. terrae</i>
WT1	AACCAGCTGAGCCAAATTC	Wild Type 509-514
WT2	ATGGACCAGAACAACCCG	Wild Type 515-520
WT3	AAACTGTCGGGGTTGACC	Wild Type 521-525
WT4	TTGACCCACAAGCGCCGA	Wild Type 524-529
WT5	CTGTCGGCGCTGGGGC	Wild Type 530-534
MT1	CTGTTGGCGCTGGGGC	Mutant Type 531TTG
MT2	AAAACCAACAAGCGCCGA	Mutant Type 526AAC
MT3	AATGGTCCAGAACAACCCG	Mutant Type 516GTC
MT4	AAAGCTGACCCCATTCAT	Mutant Type 513CCA
MT5	AAAGCCGAGCCCATTCAT	Mutant Type 511CCG

<44> 상기 표 1의 각 올리고머 프로브들은, 각 마이코박테리아 군종에 따라 특이적으로 결합할 수 있도록 그 서열을 제작하였으며, 그 서열은 하기 서열목록 3~20에 나타내었다.

<45> 또한, WT1, WT2, WT3, WT4 및 WT5의 올리고머 프로브는 각각 PCR 증폭산물의 서열 중, 509-514, 515-520, 521-524, 525-529 및 530-534 뉴클레오타이드 위치의 야생형을 검출할 수 있으며, MT1, MT2 MT3, MT4, 및 MT5는 각각 531 위치의

TTG 돌연변이, 526 위치의 AAC 돌연변이, 516 위치의 GTC 돌연변이, 513 위치의 CCA 돌연변이, 511 위치의 CCG 돌연변이를 특이적으로 검출할 수 있다.

<46> 도 5에서 보는 바와 같이, WT1~5의 올리고머 프로브에 의해 리버스 블랏 하이브리드형성시, 밴드가 형성되지 않을 경우 리팜핀 감수성 유전자 부위에 돌연변이가 일어난 것이며, 이러한 돌연변이형을 검출함으로써, 결핵균이 리팜핀 내성을 갖는지를 확인할 수 있다.

<47> 한편, 상기 표 1의 각 올리고머 프로브들은, 동일한 온도에서 하이브리드형성이 이루어지도록 하면서, 각 올리고머 프로브가 각 검체에 대한 특이도 (specificity) 및 민감도를 갖도록 하기 위하여, 각 올리고머 프로브의 길이 및 GC 함량과 부적당한 결합(mismatch)의 위치 등을 적절하게 조절하는 것이 바람직하다. 특히, 민감도가 낮은 올리고머 프로브의 경우, 5'-말단에 몇 개의 비특이 뉴클레오타이드를 첨가함으로써, 올리고머 프로브가 막 및 표적검체에 결합하는 효율을 높일 수 있다.

<48> 또한, 모든 올리고머 프로브는, 5'-말단에 아미노기를 붙여 올리고머 프로브의 아미노기를, 막 표면의 카르복실기에 공유결합시켜, 올리고머 프로브가 상기 막에 안정하게 부착시킴으로써, 리버스 블랏 하이브리드형성 수행시, 상기 올리고머들이 자유롭게 움직이는 것을 막는 것이 중요하다. 여기에서 사용되는 막은, 표면에 카르복실기가 존재한다면 특별히 한정되지는 않고, 예를 들면 비오딘-C 막(Biodyne-C membrane; Pall Biosupport, East Hills, NY) 등이 있다.

<49> 요약하자면, 본 발명은, 결핵균 및 MOTT의 동정 및 rpoB 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 마이코박테리아의 항결핵제에 대한 내성 여부를 검출하기 위해

서, *rpoB* 유전자 상의 531bp의 단편을 증폭하기 위한 프라이머, 상기 표 1에 기재된 올리고머 프로브 및 상기 올리고머 프로브들이 부착된 막을 제공한다.

<50> 또한, 본 발명은 상기 프라이머, 표 1의 올리고머 프로브 및 막을 포함하는 키트, 또는 상기 프라이머 및 표 1의 올리고머 프로브들이 부착된 막을 포함하는 키트를 제공한다.

<51> 이하, 본 발명을 실시예를 통해 더욱 구체적으로 설명하지만, 본 발명이 이에 의해서 한정되지 않고, 당업계에서 통상적으로 받아들여지는 변형 및 적용들도 본 발명의 범위에 포함된다.

<52> [실시예]

<53> 1. 마이코박테리아 균종

<54> 본 실험에 사용된 결핵균 및 MOTT의 표준 균종은 하기 표 2에 표시하였다. 본 실험에 사용된 임상에서 분리된 결핵균주의 리팜핀 감수성검사는 결핵연구원 미생물부 분자생물과의 결핵균 약제감수성 검사팀에서 시행하였으며, MOTT 균주의 동정은 미생물부 분자생물과의 마이코박테리아 균동정 검사팀에서 종래의 미생물학적, 생화학적 방법 및 본 발명자에 의해 개발된 PCR-RFLP 방법에 의해 동정하였다.

<55>

【표 2】

	Species	Strain	Source		Species	Strain	Source
1	<i>M. abscessus</i>	Pettenkofer Inst.	YUMC	23	<i>M. intermedium</i>	ATCC 51848	KIT
2	<i>M. africanum</i>	ATCC 25420	KIT	24	<i>M. kansasii</i> type I-V		Pasteur Inst.
3	<i>M. arcinogenes</i>	ATCC 35753	KIT	25	<i>M. malmoense</i>	ATCC 29571	KIT
4	<i>M. asiaticum</i>	ATCC 25276	KIT	26	<i>M. marinum</i>	ATCC 927	KIT
5	<i>M. aurum</i>	ATCC 23366	KIT	27	<i>M. microti</i>	ATCC 19422	KIT
6	<i>M. austroafricanum</i>	ATCC 33464	KRIBB	28	<i>M. moriokaense</i>	ATCC 43059	KRIBB
7	<i>M. avium</i>	ATCC 25291	KIT	29	<i>M. mucogenicum</i>	ATCC 49650	KIT
8	<i>M. bovis</i>	ATCC 19210	KIT	30	<i>M. neoaurum</i>	ATCC 25795	KIT
9	<i>M. bovis</i> BCG	French Strain 1173P2	KIT	31	<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530	KIT
10	<i>M. celatum</i> type I/II	ATCC 51130/ ATCC 51131	KIT	32	<i>M. parafortuitum</i>	ATCC 19686	KIT
11	<i>M. chelonae</i>	ATCC 35749	KIT	33	<i>M. peregrinum</i>	ATCC 14467	KIT
12	<i>M. chitae</i>	ATCC 19627	KIT	34	<i>M. phlei</i>	ATCC 11758	KIT
13	<i>M. fallax</i>	ATCC 35219	KIT	35	<i>M. pulveris</i>	ATCC 35154	KRIBB
14	<i>M. fortuitum</i> type I/II	ATCC 6841/ ATCC 49404	KIT	36	<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981	KIT
15	<i>M. gallinarum</i>	ATCC 19710	KRIBB	37	<i>M. smegmatis</i>	ATCC 19420	KIT
16	<i>M. gastri</i>	ATCC 15754	KIT	38	<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799	KIT
17	<i>M. genavense</i>	ATCC 51233	KIT	39	<i>M. terrae</i>	ATCC 15755	KIT
18	<i>M. gilvum</i>	ATCC 43909	KIT	40	<i>M. thermoresistibile</i>	ATCC 19527	KIT
19	<i>M. gordonae</i> type I-IV	ATCC 14470	KIT	41	<i>M. triviale</i>	ATCC 23292	KIT
20	<i>M. haemophilum</i>	ATCC 29548	KIT	42	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 27294	KIT
21	<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	KIT	43	<i>M. ulcerans</i>	ATCC 19423	KIT
22	<i>M. interjectum</i>	ATCC 51457	KIT	44	<i>M. vaccae</i>	ATCC 15483	KIT
				45	<i>M. xenopi</i>	ATCC 19250	KIT

<56> 2. DNA분리

<57> 상기 표 1의 균주 배양물 1 루프(loop) 정도를 0.4ml의 ddH₂O(이차 증류수)가 들어있는 1.5ml 실험용 튜브에 넣고 잘 혼합하여, 균액을 준비하였다. 상기 준비된 균액을 5분 정도 끓여서, 균의 게놈 DNA를 얻었다. 이후, 상기 분리된 게놈 DNA 5μl 정도를 PCR 반응에 사용하였다.

<58> 본 실시예에서는, 객담(喀痰)으로부터 DNA를 분리하였는데, 객담에 동량의 4% NaOH를 처리한 후, 이를 50ml 펠콘 원심분리용 튜브로 옮긴 다음, 볼텍싱(vortexing)하여 균질화시킨 후, 용액을 15분간 실온에서 반응시켰다. 그런 다음, 전체 용량을 50ml가 되도록 증류수를 첨가한 뒤, 3,000rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 그런 다음, 상층액을 버리고, 펠렛을 볼텍싱한 다음, 이중 용액 500 μ l를 1.5ml 튜브로 옮겼다. 그런 다음, 튜브에 2% NaOH를 500 μ l 다시 처리한 후, 볼텍싱하여 잘 섞은 다음, 2분간 끓여주었다. 그런 다음, 12,000rpm에서 3분간 원심분리한 후, 상층액을 제거한 뒤, 펠렛에 0.1M Tris-Cl(pH 6.8)를 1ml 처리한 다음, 볼텍싱 후, 다시 12,000rpm에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 제거하였다. 펠렛에 글래스 비드(glass bead)를 100 μ l 첨가한 다음, 1분 30초 동안 비드 교반기(bead beater)를 이용하여 교반하였다. 상층액을 얻어내고, 얻어진 DNA 용액 5-10 μ l를 이후 PCR 증폭에 이용하였다.

<59> 2. PCR 증폭

<60> KCl 50mM, Tris-HCl 10mM (pH 8.3), MgCl₂ 1.5mM, 젤라틴(gelatin) 0.001% (w/v), dNTP 각각 200 μ M, Taq 폴리머라아제 1.25 유닛(unit), 프라이머 10pmole 및 게놈 DNA 50-100ng을 함유하는 혼합액 50 μ l를 제조하고, 상기 혼합액을 PCR 반응에 이용하였다. PCR 반응은, 95℃의 변성(denaturation) 온도에서 5분; 94℃의 변성온도에서 30초, 58℃의 어닐링(annealing) 온도에서 30초 및 72℃의 중합(elongation) 온도에서 45초의 사이클을 35번 반복; 및, 최종 중합반응으로 72℃에서 10분을 수행하였다. 상기 PCR 증폭에 사용한 프라이머의 염기서열은

다음과 같고, 그에 의해서 PCR 증폭된 산물의 부위는 도 1에서 보는 바와 같다.

또한, 증폭된 531bp의 DNA 단편의 서열은 도 7에 나타내었다.

<61> MOTT-rpo-long-B-5': 5'-TCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGC-3'

<62> TR8-long-NB-3': 5'-ACGGGTGCACGTCGCGGACCTCCA-3'

<63> 반응이 완료된 반응액 5 μ l 정도를 1.0% 아가로스 겔 전기영동시킨 결과, 531bp의 PCR 산물을 확인하였다.

<64> 3. 올리고머 프로브

<65> 결핵균 및 특정 MOTT를 검출할 수 있는 프로브와 결핵균의 리팜핀 감수성 여부를 판정할 수 있는 감수성 및 내성 결핵균의 검출 프로브는 각각 *rpoB* 유전자를 이용하여 고안되었다. 각 올리고머 프로브들이 동일한 온도에서 하이브리드 형성이 이루어지도록 하면서, 각 올리고머 프로브가 각 검체에 대한 특이도 (specificity) 및 민감도를 갖도록 하기 위하여, 각 올리고머 프로브의 길이 및 GC 함량 등을 적절하게 조절하였다. 특히, 민감도가 낮은 올리고머 프로브의 경우, 5'-말단에 몇 개의 비특이 뉴클레오타이드를 첨가함으로써, 올리고머 프로브가 막 및 표적검체에 결합하는 효율을 높였다. 각 올리고머 프로브의 서열은 상기 표 1에 명시하였다. 또한, 모든 올리고머 프로브의 5'-말단에는 아미노기를 붙여서, 올리고머 프로브의 아미노기가 비오딘-C 막 표면의 카르복실기에 공유 결합되어, 올리고머 프로브가 상기 막에 안정하게 부착된 리버스 블랏 (reverse blot) 검사용 막을 제조하였다.

<66> 4. PCR-리버스 블랏 하이브리드형성

<67> PCR 반응 후 아가로스 겔에서 531bp 크기의 PCR 산물이 확인된 PCR 산물 10 μ l과, 상기 제조된 올리고머 프로브들이 부착된 비오딘-C 막(Byodyne-C membrane)을 이용하여 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성을 실시하였다. 올리고머 프로브와 PCR 산물의 로딩(loading)은 Miniblotter-MN45(Immunetics, Cambridge, MA)를 사용하여 수행하였다.

<68> PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 방법을 간단히 설명하면, 증폭이 확인된 PCR 산물 10 μ l에 150 μ l의 2x SSPE/0.1% SDS를 첨가하여 희석하고, 이를 99°C에서 10분간 해리시킨 후, 얼음 위에서 재빨리 식혔다. PCR 산물을 막에 로딩하기 전에, 막을 100ml의 2x SSPE/0.1% SDS 용액에 넣고 실온에서 5분동안 반응시킨 다음, 이 막을 미니블랏터(miniblotter)상에 놓인 지지체 쿠션(support cushion) 위에 올려놓았다. 슬롯(slot) 내 여분의 물기를 흡입장치(aspirator)로 제거하고, 상기 희석된 PCR 산물은 슬롯이 올리고머 프로브들이 붙은 방향과 수직이 되도록 하여 로딩하였다. 올리고머 프로브가 붙어 있는 방향은 잉크를 이용하여 막에 사전에 표시하였다. PCR 산물이 로딩된 슬롯 주변의 빈 슬롯은 2x SSPE/0.1% SDS로 채워서 교차흐름(cross-flow)을 방지하였다. 바닥이 고른 50°C 배양기에서, 2시간 하이브리드형성 반응을 진행하였다. 인근 슬롯간의 교차흐름을 방지하기 위해서, 막을 교반하지 않았다. 흡입장치를 이용해서 시료를 미니블랏터로부터 제거하고, 막을 미니블랏터에서 떼어낸 뒤, 100ml의 2x SSPE/0.5% SDS로 57°C에서 10분간 두 번 세척하였다. 그런 다음, 막을 집기병(rolling bottle)에 넣고, 2x SSPE/0.5% SDS의 용액에 의해 1:2000으로 희석한 스트렙타비딘-알카린 포스파타아제 컨쥬게이트(Streptavidine-Alkaline

Phosphatase conjugate) 용액 10ml을 붓고, 42℃에서 60분간 반응시킨다. 그런 다음, 막을 2x SSPE/0.5% SDS 용액 100ml에 넣고, 42℃에서 10분간 두 번, 2x SSPE 용액 100ml로 5분간 두 번 세척하였다. 하이브리드형성이 완료된 후, 화학 현광 검출(Chemiluminiscent detection)을 위해, 상기 막에 10ml의 CDP-Star™ detection reagent(Amersham pharmacia biotech., Buckinghamshire, England)에 넣고 4분간 반응시켰다. 그런 다음, 상기 막을 오버헤드 시트(overhead sheet) 또는 랩(wrap)으로 싸고, X-레이 필름을 막에 30분간 노출시키고(필요한 경우에는 더 2시간까지 필름을 노출), 결과를 확인하였다.

<69> 5. 결과

<70> 1) 마이코박테리아 표준균주를 이용한 *rpoB* 유전자의 PCR 증폭

<71> 결핵연구원에서 보유하고 있는 아종을 포함한 54가지 종류의 표준균주(ATCC에서 분양 받음)를 대상으로 *rpoB* 유전자 부위를 상기의 방법에 의해 PCR 증폭하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 보는 바와 같이, 프라이머 MOTT-rpo-long-B-5' 및 TR8-long-NB-3'은 결핵균 및 MOTT의 동정이 가능한 부위와 항결핵제 내성 관련 유전자 부위를 포함하는 531bp 크기의 부위를 모든 마이코박테리아에서 증폭하는 것을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

<72> 2) 마이코박테리아 표준균주를 이용한 *rpoB* 유전자의 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 분석

<73> 마이코박테리아 표준균주의 게놈 DNA로부터 증폭한 PCR 산물을 이용하여, 각 마이코박테리아의 종 특이적 올리고머 프로브가 부착된 막으로 하이브리드형

성을 시켜, 각 마이코박테리아 균종 동정이 가능한지의 여부를 확인하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3에서 보는 바와 같이, (1) 대부분의 마이코박테리아는 마이코박테리아-특이적 올리고머 프로브에 모두 결합하였고, (2) 종-특이적 올리고머 프로브에는 해당 균으로부터 얻어진 PCR 산물만이 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 이는, 본 발명의 올리고머 프로브들이 결핵균 및 MOTT의 분리에 유용하게 사용할 수 있음을 나타낸다. 한편, (3) 종-특이적 올리고머 프로브에는 해당 종 이외의 마이코박테리아로부터 얻어진 PCR 산물과는 결합하지 않음을 확인할 수 있었다.

<74> 도 3에서 보는 바와 같이, *M. 고도나에*, *M. 칸사시* 및 *M. 포르투이툼*의 경우, 하나의 종에 속하는 아류(subtype)가 여러 개 있으며, 각 아류간에 약간의 서열 다형성이 존재하여, 각 아류(subtype) 또는 이를 포함하는 올리고머 프로브를 만들어 사용하였다. 단, *M. 테라에*의 경우, 모든 마이코박테리아가 결합할 수 있는 올리고머 프로브에는 결합하지 않았으나, *M. 테라에* 특이적인 올리고머 프로브에는 결합하였으므로, *M. 테라에*의 동정에 큰 영향을 미치지 않는다. 한편, *M. 케나벤스*(*genavense*)의 경우, 결핵균에 결합하는 경향이 있으나, 이 역시 *M. 케나벤스* 특정 올리고머 프로브와 특이적으로 결합하므로, 균 동정에는 큰 문제가 되지 않는다.

<75> 3) 결핵연구원에서 분리된 임상분리 마이코박테리아 균주를 이용한 *rpoB* 유전자의 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 분석

<76> 임상에서 분리된 마이코박테리아 균주를 대상으로 상기와 동일한 방법에 의

해 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성을 수행하여, 임상분리 결핵균주에 대하여 균종 동정이 가능한지를 확인하였다. 임상분리 균주는, 결핵연구원의 균동정팀에 의해 미생물학적 검사, 생화학적 검사 및 분자생물학적 방법에 의한 PCR-RFLP 검사법으로 사전에 동정된 결핵균주 및 임상학적 의의나 분리빈도 면에서 의의가 있는 MOTT 균주를 사용하였다. 상기 임상학적 의의나 분리빈도 면에서 의의가 있는 MOTT 균주로는, 질병과의 관련이 있는 *M. 아비움-인트라셀룰라레* 복합체, *M. 칸사시이*, *M. 마리눔*, *M. 포르투이툼*, *M. 켈로나에*, *M. 압스세수스*; 드물게 발견되는 병원성균으로서 *M. 말모엔스*, *M. 아시아티쿰*, *M. 제노피*, *M. 시미내에*, *M. 스크로폴라세움*, *M. 논크로모켈니쿰*, *M. 페레그리눔*, *M. 스줄가이*, *M. 해모필룸*, *M. 얼서란스*; 및, 비병원성으로 간주되지만 발현빈도가 높은 *M. 테라에*, *M. 고도내에* 등을 포함한다. 이중, 결핵연구원에서 주로 분리되는 균주로는 *M. 아비움*, *M. 인트라셀룰라레*, *M. 포르투이툼*, *M. 테라에*, *M. 고도내에*, *M. 켈로나에*, *M. 압스세수스* 등이다.

<77> 따라서, 이와 같이 임상적 의의가 있거나 빈도가 갖게 분리되는 균주 중, 국내에서 분리 빈도가 높은 균을 중심으로 MOTT 균주를 선택하여, PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 분석을 실시하였다. 실험에 선택한 MOTT 균주 및 그 실험 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에서 보는 바와 같이, 본 실험에서 분석한 각 임상분리 마이코박테리아 균주는, 각각에 해당하는 올리고머 프로브에 특이적으로 하이브리드형성되어, 미생물학적 검사, 생화학적 검사 및 분자생물학적 방법과 동일하게 균정이 동경됨을 확인할 수 있었다.

<78> 따라서, 본 발명의 방법은 정확하고 신속하며, 민감도가 매우 높게 균종을 동정할 수 있다. 더욱이, 몇몇 균체의 경우에는, 여러 종의 MOTT가 함께 존재하는 혼합 균락(mixed population)을 이름을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 종래의 미생물학적 배양방법 및 생화학적 분석, PCR-RFLP 등의 방법으로는 확인할 수 없는 결과였다.

<79> 4) 결핵균동정 및 리팜핀 약제감수성 동시 검사

<80> 본 발명의 방법을 통해, 결핵균 및 MOTT 균종의 동정과 함께, 결핵균으로 동정되었을 때, 항결핵약제인 리팜핀에 대한 결핵균의 약제 감수성 여부를 검출할 수 있는지를 확인하기 위해, 리팜핀 감성균주 및 리팜핀 내성균주에 대하여 상기와 같은 방법으로 *rpoB* 유전자 부위의 PCR 증폭 및 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 보는 바와 같이, 리팜핀 감수성 균주 및 리팜핀 내성균주 모두가 결핵균으로 확인됨과 동시에, 리팜핀 약제에의 감수성 및 내성 여부가 정확하게 진단되는 것을 확인할 수 있었다.

<81> 5) 객담에서 분리된 DNA를 이용한 마이코박테리아 균동정 및 결핵균의 리팜핀 약제감수성 검사

<82> 빠른 산 염색법(32)(Acid fast staining)에 의해 도말 양성으로 진단된 37개의 객담으로부터 DNA를 분리하고, 이를 이용하여 *rpoB* 유전자 부위를 PCR 증폭한 후, 얻어진 PCR 산물을 이용하여 상기와 동일한 방법에 의해 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 분석을 수행하여, 균동정 및 리팜핀 감수성 검사를 동시에 수

행하였다. 그 결과, 도말 양성인 객담 검체 중, 결핵균과 MOTT의 구분이 가능하였으며, 동정된 결핵균의 리팜핀약제에 대한 감수성 및 내성 판정이 동시에 수행됨을 확인하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 보는 바와 같이, 모든 시료에서 모두 결핵균이 검출되었고, 특히 라인 29의 시료는 리팜핀 내성균인 것으로 검출되었다.

【발명의 효과】

<83> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 방법은 *rpoB* 유전자 영역의 PCR 증폭 산물부터 결핵균 및 MOTT 균주를 동정하고, 결핵균으로 동정될 경우, 결핵균의 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 얻어지는 리팜핀과 같은 항결핵제에 대한 내성여부를 동시에 검출할 수 있기 때문에, 기존의 미생물학적 방법에 의한 균체 동정 및 리팜핀 감수성 검사에 각각 3~4주 소요되었던 것에 비해, 본 발명의 방법으로는 총~2의 검사기간으로도 단축되고, 본 발명에 의한 검사결과는 매우 정확하며, 검사기간 중 균체 접촉할 기회가 적으므로 숙련가가 아니더라도, 손쉽게 균주 동정 및 리팜핀 감수성 검사를 수행할 수 있다.

<84> 참고문헌

<85> 1. Global Tuberculosis Programme. Global Tuberculosis Control, WHO Report 1997. World Health Organization, 1997.

- <86> 2. Dolin P. J., Ravighion M. C., Kochi, A. (1994) Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull World Health Organization. 72(2)213-220.
- <87> 3. Kochi A. (1992) The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*. SCI. 72:1-6.
- <88> 4. Styblo K., Epidemiology of Tuberculosis the Hague, Royal Netherland tuberculosis Assosiation. p83, 1991 In: 보건복지부, 대한결핵협회. 2000년대 의 결핵관리대책, p5, 1997.
- <89> 5. Sreevatsan S. Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Mogha SL. Jacobs WR Jr, Telenti A, Musser JM. (1997) Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1677-1681.
- <90> 6. Narain J. P., Raviglione M. C., Kochi A. (1992) HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. *Tuber Lung Dis*. SCI. 73(6):311-321.
- <91> 7. Global Tuberculosis Programme. Anti-tuberculosis drug resistance, WHO Report 1997. World Health Organization, 1997.
- <92> 8. Ariel, P. M., M. C. Raiglion, A. Laszlo, N. Binkin, H. L. Rieder, F. Buster, D. L. Cohn, C. S. B. L. van weezenbeck, S. J. Kim, P. Chaulet,

P. Nunn. (1998) Global surveillance for antituberculosis-drug resistance.
New England J. of Medicine. SCI. 338:1641-1649.

<93> 9. Centers for Disease Control. (1992) National action plan to combat
multidrug-resistant tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 41(RR-11):5-48.

<94> 10. Global Tuberculosis Programme. Global project on Anti-tuberculosis
Drug Resistance Surveillance. WHO Report 1997. World Health Organization,
1997

<95> 11. Tuberculosis: A Global Emergency (news). World Health Forum,
14(4):438, 1993. In:보건복지부, 대한결핵협회. 2000년대의 결핵관리대책, 1997

<96> 12. 1996 한국의 보건복지지표. p412 한국보건사회연구원, 1997

<97> 13. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston
M. J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T. (1993) Detection of
rifampicin-resistance mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. SCI.
341:647-50.

<98> 14. Vareldzis B. P., Grosset J., de Kantor I., Crofton J., Laszlo A.,
Felten M., Raviglione M. C., Kochi A. (1994) Drug-resistant tuberculosis:
laboratory issues. World Health organization recommendations. *Tuber Lung
Dis*. SCI. 75(1):1-7.

<99> 15. Kochi A., Vareldzis B., Styblo K. (1993) Multidrug-resistant
tuberculosis and its control. *Res Microbiol*. SCI. 144(2):104-110.

- <100> 16. Timpe A, Runyon EH: The relationship of 'atypical' acid-fast bacteria to human disease: A preliminary report. *J Lab Clin Med.* 44: 202, 1954.
- <101> 17. Jenkins, P. A.: Lipid analysis for the identification of mycobacteria. *An appraisal. Rev. Infect. Dis.* 3: 382-866, 1981.
- <102> 18. Tsang, A., I. Drupa, M. Goldgerg, J. McClatchy, and P. Brennan. 1983. Use of serology and thin-layer chromatography for the assembly of an authenticated collection of serovars within the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
- <103> 19. Butler, W. R., K. C. Jost, Jr., and J. O. Kilburn. 1991. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 29:2468-2472.33:285-292.
- <104> 20. Kox LFF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM and Kolk AHJ: PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of Mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 33: 3225-3233, 1995.
- <105> 21. Sanguinetti M, Posteraro B, Ardito F, Zanetti S, Cingolani A, Sechi L, de Luca A, Ortona L and Fadda G: Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridization assay for rapid identification of *Mycobacterium* species growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 36: 1530-1533, 1998.

- <106> 22. Garcia, M. J. and E. Tabares : Separation of *Mycobacterium gadium* from the rapidly growing mucobacteria on the basis of DNA homology and restriction endonuclease analysis. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2265-2269, 1986.
- <107> 23. Rubina, P., J. T. Kuach, and P. Mounts : Isolation and restriction endonuclease analysis of mucobacterial DNA. *J. Gen. Microbiol.* 132: 541-551, 1986.
- <108> 24. Bai, G. H. : Rapid identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium. intracellulare* by the amplification of rRNA sequeunces. *J. Kor. Soc. Micro.* 27(5): 443-448, 1992.
- <109> 25. Lee, H., H. Park, S. Cho, G. Bai and S. Kim. 2000. Species identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the rpoB gene. *J. Clin. Microbiol.* 38:2966-2971.
- <110> 26. Kamerbeek, J., Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907-914.
- <111> 27. Woods, G. L. and T. A. Washington II. : *Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis* : Review of microbiologic and clinical aspects. *Rev. Inf. Dis.* 9(2): 275-294, 1987.

- <112> 28. Jenkins, P. A. : Mycobacteria in the environment. *J. Appl. Bact. Sym. Suppl.* 70: 1375-1415, 1991.
- <113> 29. Tsukamura, M., H. Shimoide, A. Kuse : Epidemiologic studies of lung disease due to mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Rev. Inf. Dis.* 3(5): 997-1007, 1981.
- <114> 30. O'brien, R. J., Geiter, L. J., and Snider, D. E. : The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 1007-1014, 1987.
- <115> 31. Bai, G. H., Park, K. S., and Kim, S. J. : Clinically isolated mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* from 1980 to 1990 in Korea. *J. Kor. Soc. Micro.* 28(1): 1-5, 1993.
- <116> 32. Laboratory services in Tuberculosis control, Part II. Microscopy, Global Tuberculosis Programme, World Health Organization 1998.

【특허 청구범위】**【청구항 1】**

- 1) 검체 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;
 - 2) 프라이머로서 서열번호 1 및 서열번호 2를 사용하여, 상기 DNA로부터 *rpoB* 유전자 상의 531bp 크기의 유전자 단편을 PCR 증폭하는 단계;
 - 3) 서열번호 3 내지 30의 올리고머 프로브가 부착되어 있는 막과, 상기 단계 2)에서 얻어진 PCR 증폭산물을 하이브리드형성시키는 PCR-리버스 블랏 하이브리드형성 단계;
- 를 포함함을 특징으로 하는 결핵균 및 비결핵균 마이코박테리아의 동정 및 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 내성이 부여되는 항결핵제에 대한 내성 또는 감수성을 동시에 검출하는 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 항결핵제는 리팜핀(rifampicin) 또는 그의 유도체임을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

rpoB 유전자 상의 531bp 크기의 유전자 단편을 PCR 증폭하기 위한 서열번호 1 및 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 프라이머.

【청구항 4】

서열번호 2 내지 서열번호 30에 기재된 서열을 갖는 결핵균 및 비결핵균 마이코박테리아의 동정 및 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의해 내성이 부여되는 항결핵제에 대한 내성 또는 감수성 동시검출용 올리고머 프로브.

【청구항 5】

제 4항에 기재된 염기서열이 부착된 막(membrane).

【청구항 6】

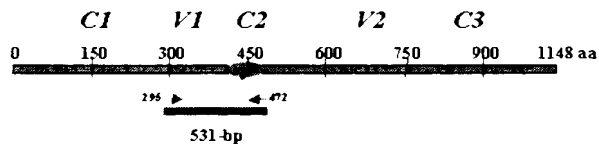
제 5항에 있어서, 상기 막은 비오딘-C 막(Byodyne-C membrane)임을 특징으로 하는 막.

【청구항 7】

제 3항에 기재된 프라이머, 제 4항에 기재된 올리고머 프로브 및 제 5항에 기재된 막을 포함함을 특징으로 하는 결핵균 및 비결핵균 마이코박테리아의 동정 및 리팜핀에 대한 내성 또는 감수성 동시검출용 키트.

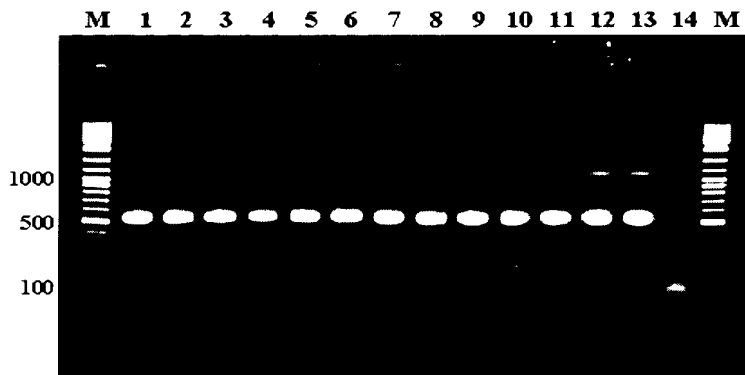
【도면】

【도 1】

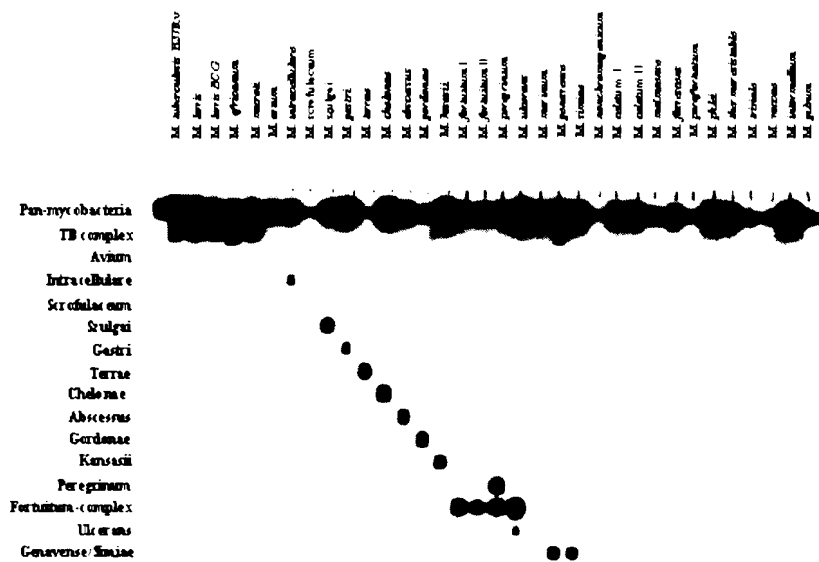


결핵균의 *rpoB* 유전자

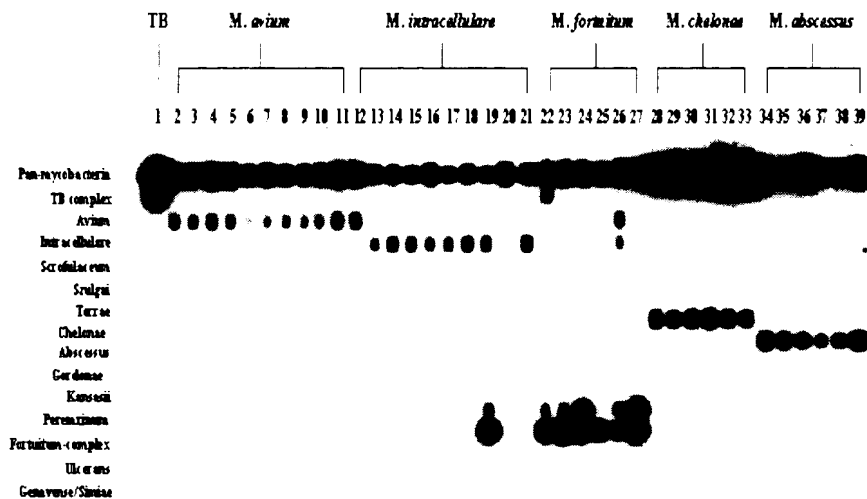
【도 2】



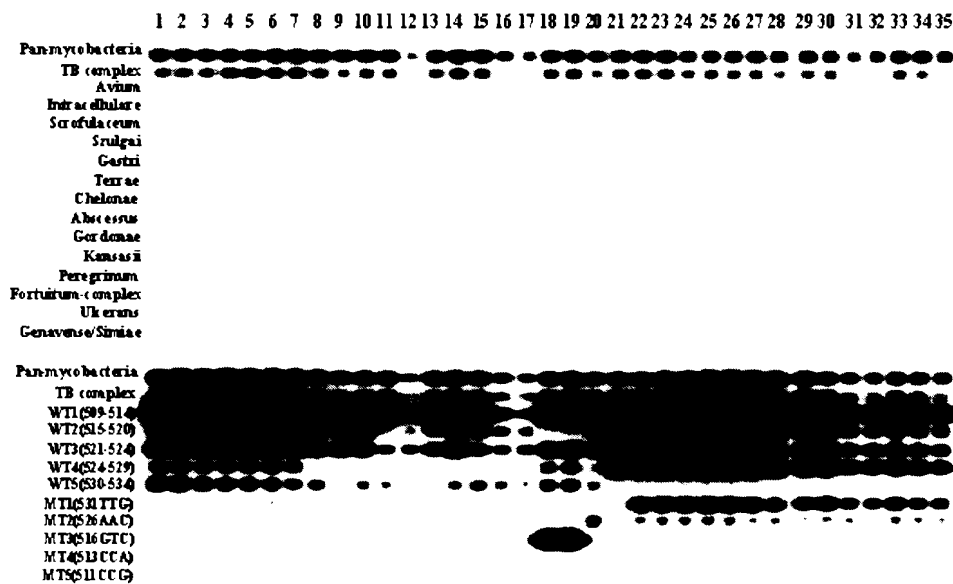
【도 3】



【도 4】



【도 5】



[illegible]

총 531 bp의 크기

Tca aggagagaggg ctatgagact g gc (43)
 (103)
 (163)
 cgacc acttcggcaa (223)
 ccgccgcctg cgtacggtcg gcgagct gat ccaaaacag atccgggtcg gcattgcgcg (283)
 gatggagcgg gtggtccggg agcggat gac caccagjac gtggaggcga tcacaccgca (343)
 gacgttgatc aacatccggc cgttggtcgc cgcgatcaag gattcttcg gcaccagcca (403)
 gctgagccaa ttcatggacc agaaacaacc cgtgtcggg ttgaccacaa agcgcgagct (463)
 ctggcgctg gggcccgcg gtctgtcaag tgagcgtgac gggtcga gg tgggagagt (523)
 tcaacact

Red Letters : 프라이머 결합 부위

Green Letters: 결핵균 및 MOTT 마이코박테리아 균주의 다형성을 나타내는 부위

Blue Letters : 리팜핀 내성관련 부위

【서열목록】

<110> Xeniss Life Science Co., LTD. <120> A method for

identifying *Micobacteria tuberculosis* and non-tuberculosis

Micobacteria, together with detecting resistance to an
 antituberculosis drug of Micobacteria obtained by mutation of rpoB
 gene <130>: PA01128 <160>: 30 <170>: KopatentIn 1.71
 <210>: 1 <211>: 25 <212>: DNA <213>:
 Artificial Sequence <220>: <223>: MOTT-rpo-long-B-5' primer for
 PCR amplication of rpoB gene <400>: 1 tcaaggagaa gcgctacgac ctggc
 25 <210>: 2 <211>: 24 <212>: DNA <213>:
 Artificial Sequence <220>: <223>: TR8-long-NB-3' primer for PCR
 amplication of rpoB gene <400>: 2 acgggtgcac gtcgcggacc tcca
 24 <210>: 3 <211>: 20 <212>: DNA <213>:
 Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for all types
 of Mycobacteria <400>: 3 gacgtcgtcg ccaccatcga
 20 <210>: 4 <211>: 15 <212>: DNA <213>:
 Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M.
 tuberculosis complex <400>: 4 catgtcggcg agccc
 15 <210>: 5 <211>: 19 <212>: DNA <213>:
 Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M. avium
 <400>: 5 aaacggtgag cegatcacc
 19 <210>: 6 <211>: 18 <212>: DNA <213>:
 Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M.
 intracellularae <400>: 6 aaacctgcac gcgggcga

18 <210>: 7 <211>: 21 <212>: DNA <213>:
Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M.
scrofulaceum <400>: 7 aaaaacgtac ggatggccag c

21 <210>: 8 <211>: 19 <212>: DNA <213>:
Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M. kansasii
type I + V <400>: 8 aaaggccacg atgaccgtg

19 <210>: 9 <211>: 21 <212>: DNA <213>:
Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M. kansasii
type II + III + IV <400>: 9 aaaaatctca ggatggccag c

21 <210>: 10 <211>: 21 <212>: DNA <213>:
Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M. gastrii
<400>: 10 aaaaatctca gggtggccag g

21 <210>: 11 <211>: 16 <212>: DNA <213>:
Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M.
fortuitum complex <400>: 11 cctgaacgcc ggccag

16 <210>: 12 <211>: 16 <212>: DNA <213>:
Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M.
peregrinum <400>: 12 gttccggtcg aggtgg

16 <210>: 13 <211>: 20 <212>: DNA <213>:
Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M. chelonae
<400>: 13 aaatggtgac tgcaccacg

20 <210>: 14 <211>: 20 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for *M. abscesus*
<400>: 14 aaaaggtgac caccaccacc

20 <210>: 15 <211>: 15 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for *M. ulcerans*
<400>: 15 ggccagcccca tcacc

15 <210>: 16 <211>: 16 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for *M.*
genavanse/M. simiae <400>: 16 ccagccgacg atgacg

16 <210>: 17 <211>: 19 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for *M. gordonae*
type I, III, IV <400>: 17 aaagtcggcg atccgatca

19 <210>: 18 <211>: 19 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for *M. gordonae*
type II <400>: 18 aaaaacgtcg gcaagccga

19 <210>: 19 <211>: 19 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for *M. szulgai*
<400>: 19 aaatctgaac gtcggcgag

19 <210>: 20 <211>: 19 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for *M. terrae*
<400>: 20 aaagetcagg acggtcagt

19 <210>: 21 <211>: 18 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Wild Type

509-514 <400>: 21 aaccagctga gccaatc

18 <210>: 22 <211>: 18 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for M. Wild

Type 515-520 <400>: 22 atggaccaga acaaccgc

18 <210>: 23 <211>: 18 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Wild Type

521-525 <400>: 23 aaactgtcgg ggttgacc

18 <210>: 24 <211>: 18 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Wild Type

524-529 <400>: 24 ttgaccaca agcgccga

18 <210>: 25 <211>: 16 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Wild Type

530-534 <400>: 25 ctgtcggcgc tggggc

16 <210>: 26 <211>: 16 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Mutant Type

531TTG <400>: 26 ctgttggcgc tggggc

16 <210>: 27 <211>: 18 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Mutant Type

526 AAC <400>: 27 aaaaccaaca agcgccga

18 <210>: 28 <211>: 19 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Mutant Type

516 GTC <400>: 28 aatggtccag aacaacccg

19 <210>: 29 <211>: 18 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Mutant Type

513 CCA <400>: 29 aaagctgacc ccattcat

18 <210>: 30 <211>: 18 <212>: DNA <213>:

Artificial Sequence <220>: <223>: Oligomer probe for Mutant Type

511CCG <400>: 30 aaagccgagc ccattcat

18